

18. 11. 2004



REC'D 26 NOV 2004
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 47 436.6

Anmeldetag: 13. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber: Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main, 60325 Frankfurt/DE

Bezeichnung: In vitro Verfahren zur Diagnose der kardiovaskulären Funktionalität von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP)

IPC: C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 04. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH ROME 17 NOV 04

Johann Wolfgang Goethe-Universität
U30061

In vitro Verfahren zur Diagnose der kardiovaskulären Funktionalität von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP)

Die vorliegende Erfindung betrifft ein *in vitro* Verfahren zur Analyse einer Probe aus einem Säugetier in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt: a) Isolieren von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker, und b) Überprüfung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests. Das erfindungsgemäß Verfahren kann als Kit im Rahmen der Diagnose und/oder der Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen, zur Überwachung von deren Therapie und/oder zur Stratifizierung für eine geplante Zelltherapie mit Stamm- und/oder Vorläuferzellen zur Steigerung der Perfusion von ischämischen Gewebe bzw. zur Regeneration von Gewebeverlust (z. B. Herzinsuffizienz) abgewendet werden. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung dann ein *in vitro* Verfahren zur Isolierung von spezifischen Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP), umfassend: a) Entnehmen einer Probe aus einem Säugetier-Spender, b) Isolieren von (BMP) und/oder (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker aus der so erhaltenen Probe, und c) Überprüfung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests. Diese BMP und/oder BDP können erfindungsgemäß zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder anderer Ursachen einer Herzschwäche verwendet werden und unter anderem in einer pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegen.

Post-Infarkt Herzversagen bleibt eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität. Obwohl eine prompte Reperfusion der verschlossenen Arterie signifikant verringerte Mortalitätsraten bewirkt (Lange RA, Hillis LD. Reperfusion therapy in acute myocardial infarction. N Engl J Med. 2002;346:954-5.), führen ventrikuläre Remodelling-Prozesse, die durch die progressive Expansion des Infarktbereichs und Dilatation der linken ventrikulären Kavität gekennzeichnet

sind zu der Entwicklung von Herzversagen bei einem meßbaren Teil der Patienten, die einen akuten myokardialen Infarkt überleben (Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990;81:1161 -72.). Das hauptsächliche Ziel, um ein Remodelling umzukehren, wäre die Stimulierung der Neovaskularisierung sowie die Verstärkung der Regeneration von kardialen Myocytes innerhalb des Infarktbereichs.

Kürzliche Experimente und klinische Studien haben gezeigt, daß die Transplantation von spezifischen Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) die Regeneration nach einem akuten Myokardinfarkt verbessert (Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation. 2001; 103:634-7., Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7:430-6., Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. J Am Coil Cardiol. 2001;37:1726-32.). Die Zelltherapie mit Knochenmarks-Stamm-/Vorläuferzellen ist daher eine neue Option zur Verbesserung der Neovaskularisierung und der kardialen Funktion bei ischämischer Herzerkrankung. So konnte in der Tat gezeigt werden, daß die intrakoronare Infusion von adulten Vorläuferzellen bei Patienten mit akutem Myokardialinfarkt durchführbar und sicher ist und mit signifikanten Verbesserungen in der regionalen und globalen LV (left ventricular) Funktion assoziiert ist. Die genauen Umstände der Verbesserung durch die Infusion blieben jedoch unklar. Für eine gezielte und effektive Zelltherapie mit Knochenmarks-Stamm-/Vorläuferzellen ist es zudem erforderlich sicherzustellen, daß Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) transplantiert werden, die eine möglichst hohe Regenerationsfähigkeit und somit Effektivität aufweisen.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Diagnose und/oder der Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen, zur Überwachung von deren Therapie und/oder zur Stratifizierung für eine geplante Zelltherapie auf Basis von Knochen-

marks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) zur Steigerung der Perfusion von ischämischen Gewebe bzw. zur Regeneration von Gewebeverlust bei z. B. Herzinsuffizienz zur Verfügung zu stellen.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein sicheres Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem effektive und für die Zelltherapie geeignete Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) identifiziert und isoliert werden können.

Schließlich ist es eine noch weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung zu stellen, die für die Zelltherapie geeignete und erfindungsgemäß isolierte Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) umfassen.

Gemäß eines ersten Aspekts der vorliegenden Erfindung wird eine Aufgabe der Erfindung durch ein *in vitro* Verfahren zur Analyse einer Probe aus einem Säugetier in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gelöst, wobei das erfindungsgemäße Verfahren folgende Schritte umfaßt von: a) Isolieren von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker, und b) Überprüfung/Ermittlung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests.

Überraschend konnte nun gefunden werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Neovaskularisierungskapazität und der Migrationsfähigkeit von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) besteht. Dies ermöglicht den Einsatz eines Migrationstests als wertvolles Werkzeug zur Analyse einer Probe aus einem Säugetier in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen.

Weiterhin konnte überraschend gefunden werden, daß im Knochenmark einiger Spender und/oder Herzinfarktpatienten vermuteterweise eine Dysfunktion vorliegt kann, wodurch die Zellen, die man direkt aus dem Knochenmark entnehmen kann (BMP, zum Beispiel durch Punktion) in ihrer Funktion eingeschränkt sind, neue Gefäße bilden zu können und die Herzregeneration zu unterstützen. Durch den erfindungsgemäßen Test können solche Spender effektiv ausgeschlossen werden und gleichzeitig Patienten mit einem höheren Risiko identifi-

ziert werden, die schlechtere Neovaskularisierungskapazitäten aufweisen. Diese Patienten können dann geeignet und insbesondere präventiv und/oder unterstützend behandelt werden. Alternativ können durch diesen Test auch Patienten identifiziert werden, die durch eine Vorläuferzell-Therapie einen erhöhten Nutzen erfahren können.

Die beiden oben genannten Eigenschaften der BMP und/oder BDP werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als „kardiovaskuläre Funktionalität“ verstanden.

Vasa et al. (Vasa M. et al., Circ Res 2001 Jul 6;89(1):E1-7) beschreiben, daß die Zahl und migratorische Aktivität von zirkulierenden Endothel-Vorläuferzellen (EPCs) invers mit Risikofaktoren für koronare Arterienkrankungen (CAD) korrelieren. EPCs von Patienten mit koronaren Arterienkrankungen zeigten funktionelle Beeinträchtigungen. Weiterhin wurde eine verminderte Neovaskularisierung aufgrund der EPC-Beeinträchtigungen vermutet. Die Möglichkeit einer Stratifizierung von Patienten auf Basis einer Analyse von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) wird jedoch nicht erwähnt.

Weiterhin beschreiben Vasa et al. (Vasa M. et al., Circulation, 2001 Jun 19;103(24):2885-90) eine Zunahme von zirkulierenden Endothel-Vorläuferzellen (EPCs) durch Statin-Therapie in Patienten mit stabiler CAD. Dabei wird die Neovaskularisierung durch EPCs durch Statine unterstützt. Die funktionelle Aktivität der EPCs wird durch einen migratorischen Test bestimmt. Die Möglichkeit einer Stratifizierung von Patienten auf Basis einer Analyse von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) wird jedoch ebenfalls nicht erwähnt.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, das weiterhin den Vergleich des aus der untersuchten Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe umfaßt. Solche Referenzwerte können entweder von dem individuell zu behandelnden Patienten im Laufe der Therapie gewonnen werden oder sind das Ergebnis von großflächigen Studien. Üblicherweise stammt ein Referenzwert aus einer so genannten gesunden Kontrollgruppe. Der Fachmann in diesem Bereich ist ohne weiteres in der Lage, geeignete Studien Protokolle auszuwählen, um so geeignete Referenzwerte erhalten zu können.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe aus dem Menschen stammt. Dabei kann die zu untersuchende Probe erfindungsgemäß ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Knochenmark, peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon. Die Auswahl der einzelnen Probe hängt von der Art der zu untersuchenden Vorläuferzellen und dem Verfahren zur Ermittlung der Eigenschaften der Vorläuferzellen ab. Weiter bevorzugt wird im Falle der Entnahme von Blut dem peripheren Blut ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin oder EDTA, zugesetzt. Dies erleichtert weitere Verarbeitung Schritte. In einem weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird die zu untersuchende Probe mittels Punktion aus dem Knochenmark entnommen. Diese Entnahme stellt die Grundlage für die Gewinnung von BMP dar. Die weitere Aufbereitung kann erfindungsgemäß eine Isolierung unter Verwendung von Dichte-Gradienten-Zentrifugation und/oder immunologischer Methoden, insbesondere unter der Verwendung von FACS umfassen. Dabei ist es erfindungsgemäß weiter bevorzugt, daß der für die BMP ausgewählte zellspezifische Oberflächenmarker ausgewählt ist aus CD34, CD45 und/oder CD133, und der für BDP ausgewählte zellspezifische Oberflächenmarker ausgewählt ist aus VEGFR2, CD105, vWF und/oder CD31.

Gemäß eines bevorzugten Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird der Migrationstest in einer Boyden-Kammer oder einer modifizierten Version davon durchgeführt. Dem Fachmann wird jedoch ersichtlich sein, daß weitere Verfahren zur Ermittlung der migratorischen Kapazität verwendet werden können, ohne den Bereich der vorliegenden Erfindung zu verlassen. Dies betrifft insbesondere Ausführungsformen des Migrationstests, die entweder für die Automatisierung des Tests und/oder dessen Durchführung in einem „Point-of-care“-Test angepaßt sind.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei der Migrationstest unter der Verwendung von SDF-1 als Chemo-Attraktant für BMP oder VEGF für BDP durchgeführt wird. Wie in den beigefügten Versuchen gesehen wird, ist ein bevorzugter Stimulator für BMP SDF-1, da dieser besser geeignet ist.

Voermans et al. (Voermans C, et al. Exp Haematol 2001 Dec;29(12):1456-64) die Rolle von SDF-1 induzierter Migration von hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34(+)-Zellen) und einen entsprechenden migratorischen Test.

Eine Voraussetzung für den Erfolg einer Zelltherapie ist das so genannte „Homing“, also die gezielte Wanderung von Zellen zur Ansiedlung in erwünschten Zielbereichen, insbesondere, falls eine intravaskuläre Verabreichungsroute gewählt wird. Daher wurde von den Erfindern angenommen, daß die migratorische Kapazität von adulten Vorläuferzellen in Richtung ihrer physiologischen Chemo-Attraktanten ihre Fähigkeit widerspiegeln könnte, in den Infarktbereich hinein zu wandern. In der Tat korreliert die Einwanderung von transplantierten Zellen in das betroffene Gewebe und die Verbesserung der Neovaskularisierung, die durch die intravenöse Infusion von menschlichen Vorläuferzellen induziert wurde, eng mit der SDF-1 induzierten migratorischen Kapazität für BMP und der VEGF induzierten migratorischen Kapazität für BDP. Dies waren jedoch bisher unbelegte Vermutungen, die erst durch die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuche bestätigt worden. Es war weiterhin unerwartet, daß sich diese migratorische Kapazität als unabhängiger Vorhersage-Faktor so gut eignet, daß darauf basierende Diagnostika eine Verbesserung bei der Behandlung von CAD mit sich bringen würden. Zusammengenommen offenbart die Verbesserung in der lokalen kontraktiven Funktion, die mit einer Verringerung in der Infarktgröße assoziiert ist, die unabhängig durch die Kapazität von infundierten Vorläuferzellen bestimmt wurde, in Richtung ihrer physiologischen Chemo-Attraktanten zu wandern, eine kausale Beziehung zwischen der Transplantation von Vorläuferzellen und der Regenerationsverbesserung in Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können immer ein der Diagnose und/oder Therapie aller kardiovaskulären Erkrankungen angewendet werden, bei denen von einer Transplantation von Vorläuferzellen ein therapeutischer Vorteil erwartet wird. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder anderen Ursachen einer Herzschwäche.

Gemäß einem weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung kann das erfindungsgemäße Verfahren unmittelbar vor einer Zellinfusion in den Säuger durchgeführt werden. Wie bereits oben ausgeführt können durch den erfindungsgemäßen Test solche Spender effektiv ausgeschlossen werden und gleichzeitig Patienten mit einem höheren Risiko identifiziert werden, die schlechtere Neovaskularisierungskapazitäten aufweisen. Diese Patienten können dann geeignet und insbesondere präventiv und/oder unterstützend behandelt werden. Alternativ

können durch diesen Test auch Patienten identifiziert werden, die durch eine Vorläuferzell-Therapie einen erhöhten Nutzen erfahren können. Dies betrifft in einem weiteren Aspekts des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung einer der Therapie, bei der die untersuchten isolierten BMP und/oder BDP für den zu behandelnden Patienten, insbesondere den Säuger, autolog und/oder heterolog sind.

Ein weiterer Aspekts der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, der neben Mitteln zur Durchführung der genannten erfindungsgemäßen Verfahren gegebenenfalls weitere geeignete Komponenten und/oder Hilfsstoffe enthält. Der Kit kann aus einem oder mehreren getrennten Behältern bestehen. Geeignete Komponenten können insbesondere Gebrauchs-
anweisungen oder Farbtafeln zum Abgleich von Messergebnissen anhand von Referenzwer-
ten sein.

Erfindungsgemäß wird der Kit bevorzugterweise zur Diagnose und/oder der Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen, zur Überwachung von deren Therapie und/oder zur Stratifi-
zierung für eine geplante Zelltherapie mit Stamm- und Vorläuferzellen zur Steigerung der Perfusion von ischämischen Gewebe bzw. zur Regeneration von Gewebeverlust, wie zum Beispiel bei Herzinsuffizienz, verwendet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein *in vitro* Verfahren zur Isolie-
rung von spezifischen Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zir-
kulierender Vorläuferzellen (BDP), wobei das Verfahren die Schritte umfaßt von a) Entneh-
men einer Probe aus einem Säugetier-Spender, b) Isolieren von (BMP) und/oder (BDP) mit-
tels zellspezifischer Oberflächenmarker aus der so erhaltenen Probe, und c) Überprüfung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests. Erfindungsgemäßes bevorzugt ist es, daß die zu untersuchende Probe aus einem Säuger, insbesondere dem Menschen stammt.

Wie oben bereits erwähnt, kann das erfindungsgemäße Verfahren an allen aus einem Spender gewonnenen Körperflüssigkeiten durchgeführt werden, von denen vermutet wird, daß sie geeignete BMP oder BDP enthalten. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Knochenmark, peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon. Insbesondere bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe

auf geeignete Weise aus dem Knochenmark entnommen wird. Bevorzugt ist, daß die zu untersuchende Probe mittels Punktion aus dem Knochenmark entnommen wird.

Auf Grund der Tatsache, daß bei einer Entnahme meist ein heterogenes Gemisch von verschiedenen Vorläuferzellen erhalten wird, umfaßt einen bevorzugten erfindungsgemäßes Verfahren die Isolierung unter Verwendung von Dichte-Gradienten-Zentrifugation und/oder immunologischer Methoden. Eine besonders bevorzugtes Isolierungsverfahren erfolgt unter der Verwendung von FACS, wobei der zellspezifische Oberflächenmarker für BMP ausgewählt sein kann aus CD34, CD45 und/oder CD133, und für BDP ausgewählt sein kann aus VEGFR2, CD105, vWF und/oder CD31.

Wie bereits oben erwähnt, wird in einem weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung der Migrationstest in einer Boyden-Kammer oder in einer Weiterentwicklung davon (siehe oben) durchgeführt. Auch hier ist es bevorzugt, daß der für den Migrationstest verwendete Chemo-Attraktant SDF-1 für BMP und VEGF für BDP ist.

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Ermittlung der kardiovaskulären Funktionalität von Vorläuferzellen, die aus einem bestimmten Spender entnommen wurden. Auf Basis der mittels des erfindungsgemäßem Verfahrens gewonnenen Erkenntnisse über die Brauchbarkeit und Effizienz der gewonnenen Vorläuferzellen für die Zelltherapie kann diese Therapie auf den individuellen Patienten angepaßt werden. Wie bereits oben angegeben, wird vermutet, daß im Knochenmark bestimmter Spender oder Patienten, insbesondere bei Patienten mit ICMB, eine Störung vorhanden ist, die die kardiovaskuläre Funktionalität der Vorläuferzellen beeinträchtigt. Um in bestimmten Fällen gegen diese Beeinträchtigung „gegensteuern“ zu können, stellt die vorliegenden Erfindung in einem weiteren Aspekts ein Verfahren zur Verfügung, wobei die isolierten BMP und/oder BDP weiter genetisch modifiziert werden, um die Funktion der Zellen zu verbessern. Verfahren, um die BMP und/oder BDP genetisch zu modifizieren, und dazu geeignete genetische Konstrukte sind dem Fachmann gut bekannt und können leicht durch ihn hergestellt und verwendet werden. Die genauen genetischen Mechanismen der Beeinträchtigung der kardiovaskulären Funktionalität bei bestimmten Patienten sind bisher nicht bekannt, jedoch ergaben die Experimente der vorliegenden Erfindung, daß die Migration der aus diesen Spendern stammenden Vorläuferzellen beeinträchtigt ist. Um dieser Beeinträchtigung entgegenwirken zu können, wäre es ein Ansatz, die Vorläuferzellen mit denjenigen Rezeptoren zu transzitieren, die für die jeweiligen Chemo-Attraktanten

(insbesondere SDF-1 für BMP und VEGF für BDP) spezifisch sind. So wäre ein Ansatz die Transfektion von BMP mit Expressionskonstrukten von CXCR4 oder in die Regulation von CXCR4 eingreifende Konstrukte, von dem vermutet wurde, daß er in beeinträchtigten BMP herunter reguliert vorliegen könnte. Ein anderer Ansatz wäre die Modifikation von Integrinen, wie zum Beispiel CD49a oder anderen Faktoren, wie zum Beispiel VCAM-1 oder damit interagierender Faktoren.

Ein weiterer Aspekt betrifft dann eine spezifische Knochenmarks-Vorläuferzelle (BMP) oder Blut-abgeleitete zirkulierende Vorläuferzelle (BDP), die mittels eines obengenannten erfundungsgemäßen Verfahrens hergestellt worden ist. Diese spezifische Knochenmarks-Vorläuferzelle (BMP) oder Blut-abgeleitete zirkulierende Vorläuferzelle (BDP) gemäß der vorliegenden Erfahrung kann als isolierte BMP und/oder isolierte BDP für den Säuger/Patienten (also den jeweiligen Empfänger) autolog (eigen) und/oder heterolog (fremd) sein. Möglich sind natürlich auch Gemische der Zellen.

Wie oben bereits erwähnt, können die isolierten BMP und/oder BDP im Rahmen der Zelltherapie verwendet werden. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfahrung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, das zunächst einen oben genannten erfundungsgemäßes Verfahren und weiterhin ein Formulieren der pharmazeutischen Zusammensetzung durch Mischen mit herkömmlichen pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln umfaßt. Entsprechend geeignete Träger und/oder Verdünnungsmittel sind dem Fachmann bestens bekannt und können sehr leicht an die jeweilige spezifische Applikationen angepaßt werden. Bevorzugt werden die Vorläuferzellen in der Nähe des vorher implantierten Stents infundiert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfahrung betrifft dann eine erfundungsgemäß hergestellte pharmazeutische Zusammensetzung. Die erfundungsgemäß Formulierung kann weiterhin im Gemisch mit weiteren pharmazeutisch aktiven Substanzen vorliegenden. Bevorzugt sind dabei Substanzen, die ausgewählt sind aus Aspirin, Clopidogel, ACE-Inhibitoren, Betablockern, Statinen, insbesondere Atorvastatin, Erythropoetin und/oder VEGF. Denkbar sind auch andere Substanzen, solange die diese die kardiovaskuläre Funktionalität der verabreichten Vorläuferzellen nicht nachteilig beeinträchtigen.

Zuletzt betrifft die vorliegenden Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen spezifischen BMP und/oder BDP oder einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder anderen Ursachen einer Herzschwäche. Bevorzugt ist dabei eine erfindungsgemäße Verwendung, bei der die Behandlung die Zellinfusion in den Säuger umfaßt. Dabei können auch, wie oben genannt, andere pharmazeutische aktiven Substanzen verabreicht werden, insbesondere bevorzugt umfaßt die Behandlung weiterhin die Verabreichung von Statinen, insbesondere Atorvastatin, VEGF, und/oder Erythropoetin.

Vor kurzem durchgeführte Experimente der Erfinder ergaben, daß die migratorische Kapazität der Vorläuferzellen von Patienten mit CAD sehr eng mit der neovaskulären Verbesserung nach der Transplantation in Nacktmäuse nach hinterer Lappen-Ischämie korrelierte ($r = 0,783$; $p = 0,001$; $n = 11$). Daher konzentrierten sich die Erfinder auf die Messung migratorischen Kapazität der transplantierten Vorläuferzellen unmittelbar vor der intrakoronaren Infusion in Patienten mit akutem myokardialem Infarkt, um die funktionellen Charakteristika der transplantierten Vorläuferzellen mit quantitativen Ergebnissen des Ausgangs nach 4 Monaten in Zusammenhang zu bringen. Die Ergebnisse zeigten, daß die migratorische Kapazität der infundierten Vorläuferzellen eine LV funktionelle Verbesserung und eine Infarktgrößenverringerung vorhersagte, was einen kausalen Effekt der Vorläuferzellen-Zelltherapie auf die Regenerationsverbesserung in Patienten mit akutem Myokardialinfarkt vermuten läßt.

Die vorliegende Erfindung zeigt somit zum ersten Mal, daß die funktionelle Kapazität der transplantierten Vorläuferzellen eine hauptsächliche unabhängige Determinante der anschließenden Verbesserung bei der regionalen linken Ventrikelfunktion ist und eine Infarkt-Größenverringerung nach der intrakoronaren Zelltransplantation vorhersagt. Interessanter Weise war die funktionelle Aktivität der Zellen, wie durch ihre migratorische Aktivität ermittelt, informativer, als die Zellzahl. Dies kann an der Tatsache liegen, daß die infundierten Zellen innerhalb eines relativ in den Bereichs lagen ($> 80\%$ der Patienten erhielten 5-35 Mio. BDP oder 150-350 Mio. BMP). Jedoch ist es wahrscheinlicher, daß die funktionelle Aktivität zumindest teilweise Unterschiede in den Zellzahlen überwiegen kann. Zusammengefaßt beschreiben diese Daten zum ersten Mal einen kausalen Zusammenhang zwischen Vorläufer-

Zelltherapie und der Verbesserung der linken Ventrikelregeneration in Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

Vorhergehende experimentelle Untersuchungen lassen vermuten, daß die Verbesserung in der Ventrikelfunktion nach experimentell induziertem Myokardinfarkt an einer stimulierten Neangiogenese liegt, die ein spätes myokardiales Remodelling durch verstärkten myokardialen Blutfluß, Rettung von ruhendem Myokard, die Verringerung der myokardialen Fibrose und der verringerten Apoptose von hypertrophierten Myocytes in der peri-Infarktregion bewirkt (Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation. 2001; 103:634-7., Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7:430-6., Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med. 1999;5:434-8., Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest. 2000;105:1527-36.). Zusätzlich wurde berichtet, daß die intramyokardiale Injektion von BMP zur Regeneration von signifikanten Mengen von sich kontraktierendem Myokard führte, was vermuten läßt, daß die neue Erzeugung von Myokard zu einer Verbesserung des Ausgangs von Myokardinfarkt im Anschluß an die lokale Zufuhr von adulten Vorläuferzellen führen kann. In der Tat konnte von den Erfindern kürzlich gezeigt werden, daß BDP ihre Fähigkeit beibehalten, sich in funktionelle kardiale Myocytes zu transdifferenzieren (Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. Circulation. 2003;107:1024-32.). Die gilt auch für BMP (Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickett J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001 ;410:701 -5.).

Offensichtlich kann die vorliegende Studie nicht die zellulären Mechanismen offenbaren, die mit den verbesserten linken Ventrikel Remodelling-Prozessen assoziiert sind, die im An-

schluß an einer Vorläuferzellen-Therapie stattfinden. Jedoch zeigte eine kürzliche Studie, die in Patienten mit Lappen-Ischämie durchgeführt wurde, daß die intramuskuläre Injektion von Vorläuferzellen in den gastrocnemischen Muskel zu einer signifikanten Verbesserung bei der Lappen-Perfusion führte (Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells; a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 2002;360:427-35.). In Übereinstimmung damit, daß eine intrakoronare Infusion von Vorläuferzellen mit einem verbesserten Perfusionsindex im Zielbereich assoziiert war, zeigen diese Daten an, daß die Ansiedlung der Vorläuferzellen im Infarktbereich zu einer verbesserten Neovaskularisierung führen kann, die zu einer Verringerung der LV-Dilatation und einem Erhalt der kontraktile Performance durch die Rettung von ruhendem Myokard, der Verringerung von myokardialer Fibrose und Apoptose in der peri-Infarktregion führen kann. Zusätzlich können eingewanderte Vorläuferzellen nicht nur eine Vielzahl von angiogenetischen Wachstumsfaktoren freisetzen, wodurch endogene Neovaskularisierungsprozesse in der Infarkt Grenzzone verstärkt werden, sondern auch Faktoren freisetzen, die zirkulierende oder Gewebe-residente Herz-Vorläuferzellen anlocken, wodurch endogene Reparaturmechanismen des Myokards verstärkt werden. Zuletzt, obwohl die Zahl von infundierten Vorläuferzellen nicht die anschließende funktionelle Verbesserung vorhersagte, können wir die Möglichkeit nicht ausschließen, daß angesiedelte Vorläuferzellen sich möglicherweise zu funktionell aktiven Kardiomyocyten differenziert haben, was zu einer Regeneration von signifikanten Mengen von sich kontrahierendem Myokard führen würde. Vergleiche zwischen der Transplantation von kontraktilen gegenüber nicht-kontraktilen Zellen in experimentellen Studien zeigten, daß die Verbesserung der ventrikulären Kontraktion spezifischer von kontraktilen Zellen abhängig war, wohingegen die ventrikuläre Dilatation unabhängig von den Zelltypen verbessert war (Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. Cell Transplant. 2000;9:359-68., Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, Kirn EJ, Yau TM. Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. J Thorac Cardiovasc Surg. 1999; 118:715-24.). In der vorliegenden Studie war die systolische Funktion deutlich verbessert, was mit den experimentellen Ergebnissen nach der Transplantation von Knochenmark-abgeleiteten Angioblasten übereinstimmt (Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-

derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7:430-6.).

Zusammengefaßt offenbart die Identifizierung der migratorischen Kapazität von transplantierten Vorläuferzellen als eine hauptsächliche unabhängige Determinante, um eine funktionelle Verbesserung und Infarktgrößen Verringerung im Anschluß an die intrakoronare Infusion von adulten Vorläuferzellen vorherzusagen nicht nur einen kausalen Effekt der Vorläuferzellen Therapie auf die kardiale Regenerationsverstärkung in Patienten mit akutem Myokardinfarkt, sondern kann auch wesentliche therapeutische Implikationen für eine Verbesserung der funktionellen Kapazität von adulten Vorläuferzellen vor einer Transplantation haben, um so die kardiale Regeneration nach ischämischer Verletzung weiter zu verbessern.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen weiter, daß mononukleare Zellen, die aus dem Knochenmark von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie isoliert wurden, eine signifikant verringerte Aktivität bei der Unterstützung der Neovaskularisierung in Nacktmäusen nach der Induktion von Interrupt-Lappen Ischämie aufweisen. So war die funktioneller Kapazität von BMP, bestimmt durch ihre koloniebildende Aktivität und ihre migratorische Antwort auf SDF-1 in BMP, die aus Patienten mit ICMP isoliert wurden signifikant verringert. Die Injektion dieser BMP aus Patienten mit ICMP in Mäuse mit Lappen-Ischämie zeigte eine signifikant verringerte Fähigkeit, die Lappen-Perfusion nach unilateraler Ligation der den femoralen Arterie wiederherzustellen. Es kann daraus geschlossen werden, daß die verringerte funktionelle Aktivität das Neovaskularisierungs-Potential von BMP aus Patienten mit ICMP begrenzt. Die funktionelle Beeinträchtigung von BMP aus Patienten mit ICMP kann auch deren therapeutisches Potential für die medizinische Zelltherapie begrenzen, insbesondere wenn eine intravaskuläre Route der Verabreichung verwendet wird, die erfordert, daß die Vorläuferzellen gegen einen Gradienten eines Chemo-Attraktanten extravasieren, um in ischämisches Gewebe einzuwandern. Die Überwachung der migratorischen und koloniebildenden Aktivität von Vorläuferzellen vor der Therapie kann als ein Surrogat zu Identifizierung von Patienten dienen, die einen größeren Vorteil aus der Zelltherapie herausziehen könnten. Auf der anderen Seite läßt eine kürzliche experimentelle Studie vermuten, daß voll funktionsfähige BMPs aus gesunden Spendermäusen die altersbedingte Wirts-kardiale Angiogenese in einem Mausmodell von beeinträchtigter Neovaskularisierung wieder herstellen können. Daher ist es verlockend zu spekulieren, daß eine pharmakologische oder genetische Manipulation der funktionell beeinträchtigten BMPs vor einer Infusion ihre funktionelle Ak-

tivität verbessern kann und anschließend den therapeutischen Vorteil des Patienten aus der Therapie verbessern kann.

Die Erfindung soll nun in den folgenden Beispielen unter Bezug auf die beigefügten Figuren näher beschrieben werden, ohne jedoch auf diese beschränkt zu werden. Es zeigt in den Figuren

Figur 1 die quantitative linke ventrikuläre Angiographie, die die Ausstoßfraktion (A), End-systolische und End-diastolische Volumina (B), bei Basislinie und Nachfolge für Patienten, die zirkulierende Blut-abgeleitete (BDP) oder Knochenmark-abgeleitete (BMP) Vorläuferzellen enthielten und für Patienten der nicht-randomisierten Kontrollgruppe zeigt,

Figur 2 die Korrelation zwischen Basislinien linker ventrikulärer Ausstoßfraktion und die Verbesserung in der Ausstoßfraktion mit der Regressionslinie für die gesamte Studiengruppe zeigt,

Figur 3 den Mittelwert der funktionellen Verbesserung und der Infraktgrößenverringerung für Patienten zeigt, die Vorläuferzellen entweder mit niedriger oder hoher migratorischer Kapazität zeigt.

Figur 4 die Flußzytometrische Analyse auf Vorläuferzellmarker in BMP aus den gesunden Kontrollen und Patienten mit stabiler ischämischer Kardiomyopathie. a-c, keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen den zwei Gruppen beobachtet, und

Figur 5 die funktionelle Aktivität der BMP aus den gesunden Kontrollen und Patienten mit stabiler ischämischer Kardiomyopathie. a, die koloniebildenden Einheiten pro 5×10^5 BMPs wurden nach 14 Tagen bestimmt. b, die migratorische Kapazität der BMP in Antwort auf stromale Zellen-abgeleiteten Faktor 1 (SDF-1) und c, vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor (VEGF) wurde unter der Verwendung des BioCoat® Invasionstests gemessen. d, Korrelation zwischen SDF-1 induzierter Migration und koloniebildender Kapazität und e, Korrelation zwischen VEGF induzierter Migration und koloniebildender Kapazität.

Beispiele

Patienten

Patienten zwischen 18 und 75 Jahren wurden in die Studie aufgenommen, falls sie einen ersten akuten ST-Erhöhungs myokardialen Infarkt hatten, der akut durch Koronarstent mit GPI-Ib/IIIa Blockade behandelt wurde. Ausschlußkriterien waren die Anwesenheit von kardiogenem Schock (definiert als systolischer Blutdruck < 80 mmHg, was intravenöse Pressoren oder intra-Aorta Ballon-Gegenpuls erforderte), starke Blutungen, die Bluttransfusion nach akuter Reperfusionsbehandlung erforderten, Historie von Leukopenie, Thrombocytopenie, heaptischer oder renaler Dysfunktion, Anzeichen maligner Erkrankungen oder Unwillen zur Teilnahme. Das Ethikkomitee des Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt, DE, genehmigte das Protokoll der durchgeföhrten Studie und die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki durchgeföhr. Eine schriftliche, informierte Zustimmung wurde von jedem Patienten erhalten.

Als eine interne Referenzgruppe, die den Standard der Pflege widerspiegelte, die am Krankenhaus verabreicht wurde, wurden 15 Patienten ausgewählt, die auf Ausstoßfraktion, Infarktort und Infarktgröße mit der Studienpopulation abgeglichen wurde, in denen eine akute Reperfusionstherapie durch Stent-Implantation durchgeföhr wurde und für die akute und 4 Monate Nachfolge-gepaarte LV-Angiogramme erhältlich waren.

Protokoll der durchgeföhrten Studie

Das Studienprotokoll wurde früher beschreiben (Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Circulation. 2002;106:3009-17.). Kurz gesagt wurden Patienten zufällig zum Empfang einer interkoronaren Infusion von entweder Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) 4 Tage nach AMI zugeordnet.

Bei Patienten, die Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) erhielten, wurden am Morgen des Tages der Zelltransplantation 50ml Knochenmarks-Aspirat erhalten. Knochenmarks-abgeleitete mononukleare Zellen (BMCs) wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation erhalten. Nach zwei Waschschriften wurden die Zellen in 10 ml X-vivo 10 Medium (Biowhittaker) resuspendiert. Die Zellsuspension bestand aus heterogenen Zellpopulationen, die neben hämatopoetischen Vorläuferzellen, die durch FACS-Analyse unter der Verwendung von direkt konjugierten Antikörpern gegen anti-Mensch CD34 (FITC, Becton Dickinson), anti-

CD45 (Becton Dickinson), CD14 (BD Pharmingen, San Dieago, US), CXCR4 (BD Pharmingen), CD49d (BD Pharmingen) und CD133 (Miltenyl Biotech, Bergisch Gladbach, DE) bestimmt wurden, auch andere Zelltypen enthielten (z.B. Nebenpopulations-Zellen, Stroma-Zellen, usw.). Insgesamt wurde ein Mittelwert von $5,5 \pm 3,6 \times 10^6$ CD34/CD45-positiven Zellen (in $219 \pm 82 \times 10^6$ mononuklearen Zellen) pro Patient infundiert.

Bei Patienten, die Blut-abgeleitete zirkulierende Vorläuferzellen (BDP) erhielten, wurden 250 ml unmittelbar nach der zufälligen Zuordnung (24 Stunden nach dem AMI) venöses Blut gesammelt. Mononukleären Zellen wurden in X-vivo-15 Medium (Biowhittaker, Apen, DE), ergänzt mit 1 ng/ml Träger-freiem menschlichem rekombinantem VEGF (R&D, Wiesbaden, DE), 0,1 μ M Atorvastatin (Pfizer, Freiburg, DE) und 20% menschlichem Serum, abgenommen von jedem einzelnen Patienten suspendiert. Die Zellen wurden bei einer Dichte von $6,4 \times 10^5$ Zellen/mm² auf Fibronektin-beschichteten Schalen (Roche, Grenzach, DE) ausgesät. Nach 3 Tagen Kultur wurden die Zelle mit 0,5 mM EDTA abgewaschen, zweimal gewaschen und in einem finalen Volumen von 10 ml X-vivo 10 Medium resuspendiert. Die erhaltenen Zellsuspension (Mittel der injizierten Zellen $17 \pm 12 \times 10^6$) enthielt eine heterogene Population von Vorläuferzellen. Jedoch zeigten mehr als 90% der Zellen endothele Charakteristika, wie durch Dil-acetylierte LDL-Aufnahme und Lektinbindung und die Expression von typischen Endothel-Markerproteinen einschließlich VEGFR2 (KDR) (ReliaTech, Braunschweig, DE), Endoglin (CD105) (NeoMarkers, Asbach, DE), von Willebrandfaktor (vWF) (Oncogene, Schwalbach, DE) und Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1/CD31) (Dianova, Hamburg) gezeigt wurde (Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Circulation. 2002;106:3009-17., Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adier K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. J din Invest. 2001;108:391-7., Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res. 2001;89:E1-7., Vasa M, Fichtlscherer S, Adier K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. Circulation. 2001 ,103:2885-90.).

Die Zellen wurden über einen über-den-Draht Ballonkatheter infundiert, der in den vorher während des akuten Reperfusionsverfahrens implantierten Stent vorgeschoben wurde und mit niedrigem Druck aufgepumpt, um den Blutfluß für 3 Minuten vollständig zu blockieren um eine Adhäsion und potentielle Transmigration der infundierten Zellen durch das Endothel zu ermöglichen. Diese Manöver wurde 3 Mal wiederholt, um die Infusion der gesamten 10 ml Vorläuferzellen zu ermöglichen, unterbrochen von 3 Minuten Reflux durch Deflation des Ballons, um eine extensive Ischämie zu minimieren. Nach Vervollständigung der intrakoronaren Zelltransplantation wurde eine koronare Angiographie wiederholt, um die Gefäßöffnung und einen ungehinderten Fluß von Kontrastmaterial sicherzustellen.

Ermittlung der migratorischen Kapazität von transplantierten Vorläuferzellen

Unmittelbar vor intrakoronarer Zellinfusion wurde eine Probe von Vorläuferzellen in 500 µl Endothel-Basalmedium (EBM, Cell-Systems) resuspendiert, gezählt und 2×10^4 Zellen wurden in die obere Kammer einer modifizierten Boyden-Kammer plaziert. Dann wurde die Kammer in eine 24-Tüpfel Kulturschale plaziert, die EBM und entweder 50 ng/ml VEGF zur Messung der migratorischen Kapazität von zirkulierenden Blut-abgeleiteten oder 100 ng/ml SDF-1 zur Messung der migratorischen Kapazität von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen enthielt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die untere Seite des Filters mit PBS gewaschen und mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Zur Messung wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Zellen, die in die untere Kammer wanderten wurden manuell in 5 zufälligen Mikroskopfeldern durch einen blinden Untersuchenden gezählt (Vasa M, Fichtlscherer S, AicherA, AdlerK, Urbich C, Martin H, ZeiherAM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res. 2001;89:E1-7., Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Embo J. 1999; 18:3964-72.).

Test auf koloniebildende Einheiten

BMPs (1×10^5 pro Schale) wurden auf Methylcellulose-Platten (Methocult GF H4535, die Stammzellenfaktor, G-CSF, GM-CSF, Interleukin-3, Interleukin-6 enthielten, CellSystems, St. Katharinen, DE) ausgesät. Die Platten wurden unter Phasekontrastmikroskopie untersucht

und koloniebildende Einheiten Granulocyten-Makrophage (CFU-GM; Kolonien) wurde nach 14 Tagen Inkubation durch zwei verschiedene Forscher gezählt.

Linke-ventrikuläre Angiographie

LV-Angiogramme wurden gemäß Standard-Aufnahme-Richtlinien erhalten. Die LV-Ausstoßfraktion und -Volumina wurden unter der Verwendung des Flächen-Längen-Verfahrens (Dodge HT Sh, Ballew DW, et al. The use of biplane angiography for the measurement of left ventricule volume in man. Eur Heart J. 1960;60:762-776.) berechnet, und die regionale Wandbewegung wurde mittels der Verwendung des Mittellinien-Chord-Verfahrens (Sheehan F, Bolson E, Dodge H, Mathey D, Schofer J, Woo H..Advantages and applications of the centerline method for characterizing regional ventricular function. Circulation. 1986;74:293-305.) bestimmt.

Statistische Analyse

Kontinuierliche Variablen sind als Mittel \pm SD dargestellt. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test oder Fischer's exaktem Test verglichen. Die statistischen Vergleiche zwischen anfänglichen und Nachfolgedaten wurden auf eine nicht-parametrische Weise unter der Verwendung des gepaarten Zeichen-Tests durchgeführt. Die lineare nicht-parametrische Korrelation wurde unter der Verwendung der Spearman-Korrelation berechnet. Die multivariate Analyse wurde unter der Verwendung des linearen Regressionsmodells durchgeführt. Es wurde eine statistische Signifikanz angenommen, falls $p < 0,05$. Alle statistische Analyse wurde unter der Verwendung von SPSS (Version 11.0, SPSS Inc.) durchgeführt.

Die demographischen, klinischen und angiographischen Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle I gezeigt. Es gab keine signifikanten Unterschiede in irgendeinem der Basislinien-Parameter.

Effekte der Vorläufer-Zelltherapie auf die LV Funktion

Figur 1 und Tabelle I zeigen die LV-Ausstoßfraktion, die End-systolischen und End-diastolischen LV-Volumina vor und 4 Monate nach intrakoronarer Vorläuferzell-Infusion. Die Transplantation von Vorläuferzellen war mit einer profunden Verbesserung der LV-Ausstoßfraktion von $49,2 \pm 10\%$ auf $58,3 \pm 10\%$ ($p < 0,001$, Figur 1A) und einer signifikanten Verringerung des LV End-systolischen-Volumens von $55,2 \pm 18$ ml auf $44,1 \pm 19$ ml ($p = 0,009$, Figur 1B) assoziiert, irrespektive von dem infundierten Zelltyp. Eine detaillierte

Analyse der regionalen Wandbewegung ergab die deutlichsten Verbesserungen im Grenzbe-
reich, der an den zentralen Infarktbereich angrenzte (Tabelle 2).

Im Gegensatz dazu wurde in der Referenzgruppe der Patienten, die keine Vorläuferzell-
Infusion erhielten, ansonsten jedoch gleich behandelt wurden, keine signifikanten Verände-
rungen nachgewiesen (Figur 1 und Tabelle 2). Daher war in der Referenzgruppe, trotz ähnli-
cher Ausgangswerte, die Verbesserung in der globalen LV-Ausstoßfraktion signifikant gerin-
ger ($p = 0,024$) und nahm das End-systolische LV-Volumen nach 4 Monaten eher zu ($p =$
 $0,002$).

Die Verbesserung der LV-Funktion bei den Vorläuferzell-behandelten Patienten wurde durch
Echokardiografie bestätigt und wurde in denjenigen Patienten beibehalten, die zwischenzeit-
lich einer 12 Monate Nachuntersuchung unterzogen worden (BDP n = 14, BMP n = 10). Kei-
ner dieser Patienten erfuhr irgend eine maligne Arrhythmie während der Nachfolgezeit.

Figur zwei gezeigt, daß es eine enge inverse Korrelation zwischen Ausgangslinien LV-
Ausstoßfraktion und Verbesserung in der Ausstoßfraktion während der 4 Monate Nachfolge
gab, was anzeigen, daß diejenigen Patienten mit der schwersten Beeinträchtigung in der LV-
Funktion am meisten im Hinblick auf die Verbesserung der Ausstoßfraktion profitierten, un-
abhängig von dem infundierten Zelltyp.

Effekte der Vorläufer-Zelltherapie auf die Infarktgröße, gemessen durch MRI

Die 26 Patienten, die einer seriellen anfänglichen und nach 4 Monaten Nachfolge MRI unter-
zogen worden und entschieden sich nicht von der gesamten Studie im Hinblick auf die Ver-
besserung in der LV-Ausstoßfraktion (von $50,7 \pm 8\%$ auf $60,5 \pm 8\%$, $p < 0,001$) oder der Ver-
ringerung im End-systolischen LV-Volumen (von $53,7 \pm 17\text{ml}$ auf $40,8 \pm 15\text{ml}$, $p < 0,002$).
Wichtige Weise war eine intrakoronare Vorläuferzell-Infusion mit einer signifikanten Verrin-
gerung im Volumen der Spät-Verstärkung von $39,3 \pm 34$ auf $31,6 \pm 28\text{ml}$, $p < 0,038$ vorhan-
den, was eine signifikante Infarktgrößen-Verringerung anzeigen. Wiederum gab es keine si-
gnifikanten Unterschiede zwischen Patienten, die BDP erhielten im Vergleich zu BMP-
Patienten.

Zahl und migratorische Kapazität von transplantierten Vorläuferzellen

Die absolute Zahl der infundierten Vorläuferzellen korrelierte nicht mit einer verbesserten globalen oder regionalen LV-Funktion oder mit der Infarktgrößen-Verringerung, wenn die gesamten Zellzahlen oder Untergruppen (z.B. CD34/CD45 oder CD34/CD133 positive Zellen) verwendet wurden (globale Ausstoßfraktion: BDP: $r=-0,73$, $p=0,2$; BMP: $r=-0,147$, $p=0,517$; Infarktgröße: BDP: $r=-0,187$, $p=0,5$; BMP: $r=-0,084$, $p=0,776$). Keine signifikanten Unterschiede wurde bei der funktionellen Verbesserung gefunden, wenn die Zellzahlen dichotomisiert wurden).

Im Gegensatz dazu ergab die Dichotomisierung der Vorläuferzellen migratorischen Kapazität in diejenigen oberhalb und unterhalb des Mittelwerts, daß Patienten, die Zellen mit einer hohen migratorischen Kapazität erhielten eine signifikante Verbesserung der regionalen LV-Funktion zeigte, wie durch quantitative LV-Angiographie in der Grenzzone des Infarktbereichs gezeigt wurde, verglichen Mitpatienten, die Vorläuferzellen mit geringer migratorischer Kapazität erhielten (Figur 3). Wie in Figur drei dargestellt war die absolute Verringerung in der Spät-Verstärkung Signifikanz höher in Patienten, die Zellen mit einer hohen migratorischen Kapazität erhielten verglichen mit denjenigen, die Vorläuferzellen mit geringer migratorischer Kapazität erhielten.

Jedoch waren weder die klinischen Variablen noch funktionellen Parameter vor der Zelltransplantation, wie z. B. globale LV-Ausstoßfraktion, LV End-diastolische und End-systolische Volumina oder die regionale LV-Funktion zwischen beiden Gruppen an der Ausgangslinie verschieden (Tabelle 3), was daher irgend einen potentiellen weiteren Effekte der Schwere der Erkrankung auf die Zell-migratorische Aktivität bei Basislinie ausschloß.

Multivariate Analyse von unabhängigen Vorhersage-Faktoren der funktionellen Verbesserung und Infarktgröße-Verringerung

Um unabhängige Vorhersage-Faktoren der funktionellen Verbesserung und Infarktgröße-Verringerung im Anschluß intrakoronare Vorläuferzell-Infusion in die Infarktarterie in Patienten mit akutem Myokardinfarkt an die zu identifizieren, führte die Erfinder einer multivariante Analyse durch, die alle Parameter einschloß, die statistisch signifikant oder näherungsweise durch univariate Analyse statistisch signifikant waren oder von denen bekannt war, daß sie die LV-Funktion oder Infarktgröße beeinflussen. Wie in Tabelle 4A gezeigt, blieb die migratorische Kapazität der transplantierten Vorläuferzellen der stärkste statistisch signifikante unabhängige Vorhersage-Faktor der Infarktgrößen-Verringerung, wie durch die Verrin-

gerung des Spät-Verstärkungsvolumens gemessen wurde. Der einzige andere unabhängige Vorhersage-Faktor war die Basislinien-Ausstoßfraktion, wohingegen weder die anfängliche Infarktgröße, noch das Alter, Geschlecht oder die Zeit bis zur Revaskularisierung unabhängige Vorhersage-Faktoren blieben. Ebenso, wie in Tabelle 4B zusammengefaßt, sagte die migratorische Kapazität auch unabhängig die regionale LV-Funktionsverbesserung vorher. Daher ist die migratorische Kapazität der infundierten Zellen eine hauptsächliche unabhängige Determinante der funktionellen Verbesserung und Infarktgrößen-Verringerung im Anschluß an die Vorläuferzellen-Therapie in Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

Zahl und migratorische Kapazität von BMP

Die Charakteristika und funktionelle Aktivität von BMP wurde unter der Verwendung von Knochenmarks Aspiraten von 18 Patienten mit ICMP und 8 gesamten freiwilligen untersucht.

Die Basislinien-Charakteristika der Studienpopulationen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Um zu untersuchen, ob die Zahl von Vorläuferzellen im Hinblick auf BMP bei Patienten mit ICMP im Vergleich zu der gesamten Kontrolle verringert ist, bestimmten von die Zahl von hämatopoietischen Vorläuferzellen, die durch die Expression des Markerproteins CD34 gekennzeichnet ist. Die Zahl von CD34+/CD45+ waren in sowohl der gesunden Kontrolle als auch bei Patienten mit ICMP ähnlich (*Figur 4*). Darüber hinaus unterschieden sich auch die unreiferen Untersetts von hämatopoietischen Vorläuferzellen, die als CD133+/CD34+ Zellen und nicht-zugeordnete Linie-/CD34+ definiert wurden, nicht zwischen den Gruppen (*Figur 4*).

Die Vorläuferzellenaktivität von Vorläuferzellen in Knochenmarks Aspiraten wurde weiterhin durch Messen der koloniebildenden Aktivität und Migration bestimmt. Interessanterweise zeigten BMP von Patienten mit ICMP eine signifikante verringerte Zahl von koloniebildenden Einheiten, verglichen mit BMP aus der gesunden Kontrolle ($37,3 \pm 25,0$ CFU-GM/Schale gegenüber $113,8 \pm 70,4$ CFU-GM/Schale, $p = 0,009$) (*Figur 5a*). Die migratorische Antwort auf SDF-1 und VEGF war auch in den BMP von Patienten mit ICMP Signifikanz verringert, verglichen zu BMP aus der gesunden Kontrolle (VEGF: $34 \pm 24,2$ gegenüber $54,8 \pm 29,3$ Zellen/mikroskopisches Feld; $p = 0,027$; SDF-1: $46,3 \pm 26,2$ gegenüber $108,6 \pm 40,4$ Zellen/mikroskopisches Feld; $p = 0,001$) (*Figuren 5b und c*). Übereinstimmender Weise korrigierte die koloniebildende Kapazität eng mit der migratorischen Antwort auf SDF-1 ($r = 0,65$; $p < 0,001$) (*Figur 5d*).

Unabhängige Vorhersage-Faktoren für die funktionelle Aktivität von BMP

Die SDF-1 induzierte Migration, jedoch nicht die basale Migration oder die VEGF-induzierte Migration korrelierte mit der funktionellen Verbesserung der Neovaskularisierung im hinteren-Lappen Ischämie-Modell ($r = 0,78$; $p < 0,001$) (Figur 6). Die koloniebildende Aktivität der BMP war auch signifikant mit der Neovaskularisierungs-Kapazität der Zellen assoziiert ($r = 0,74$; $p < 0,001$). Verschiedene klinische Basislinien Charakteristika der Patienten waren auch mit dem therapeutischen Effekt der BMPs in Mausmodell der hinterer-Lappen Ischämie assoziiert (Tabelle 6, linke Spalte), jedoch verloren alle Variablen außer der SDF-1-induzierte Migration ihre statistische Signifikanz, wenn die Analyse auf Patienten mit ICMP begrenzt wurde (Tabelle 6, rechte Spalte).

Tabelle 1: Demographische, klinische und angiographische Charakteristika der Studienpopulation

	BDP Gruppe n = 23	PMP Gruppe n = 23	Kontrolle (nicht randomisiert) n = 15	p-Wert
Alter (Jahre)	50 ± 10	52 ± 10	54 ± 13	n.s.
Geschlecht männlich (%)	87	86	80	n.s.
Hochdruck (%)	57	48	60	n.s.
Hyperlipidämie (%)	7	60	80	n.s.
Diabetes (%)	17	27	7	n.s.
Raucher (%)	83	91	73	n.s.
Packjahre	32 ± 24	35 ± 23	n.b.	n.s.
Familienhisto- rie auf KHE (%)	26	50	40	n.s.
KHE (1/2/3 Ge- fäßerkrankung %)	74 / 26 / 0	59 / 41 / 0	9 / 3 / 3	n.s.
Historie von KHE (%)	0	0	0	n.s.
Infarktbereich (anterior / inferi- or) (%)	65 / 35	50 / 50	60 / 40	n.s.
Infarkt zusam- menhängendes Gefäß (%)				
LAD	61	46	53	n.s.
LCX	22	4	13	n.s.
RCA	17	5	34	n.s.
Primäre Therapie	91	73	93	n.s.
PTCA / Stent (n)				
Zeit zur Neovas- kularisierung (Mittelwert / Median)	17 ± 27 / 4	32 ± 49 / 14	16 ± 24 / 5	n.s.
TIMI III Fluß post Reperfusion (%)	87	91	n.b.	n.s.
Ausstoßfraktion (visuell ge- schätzt)	43 ± 11	40 ± 8	40 ± 7	n.s.
CPR während akuter MI (n)	0	2	1	n.s.
Kreatinkinase max. (U/l)*	940 ± 725	781 ± 630	915 ± 740	n.s.

CK MB max. (U/l)*	104 ± 67	94 ± 106	146 ± 128	n.s.
Medikation nach Entlassung				
Aspirin (%)	100	100	93	n.s.
Clopidogel (%)	100	100	100	n.s.
ACE-Inhibitor (%)	96	100	93	n.s.
Betablocker (%)	100	100	100	n.s.
Statin (%)	100	100	93	n.s.
Zeit Stent zur Zelltherapie (h)	119 ± 27	111 ± 41	-	n.s.
Zahl von injizierten Zellen (Mio.)	17 ± 12	219 ± 82	-	< 0,001
Vor Zelltherapie				
Zahl der weißen Blutzellen (/nl)	12,4 ± 4,2	12,8 ± 3,6	-	n.s.
C-reaktives Protein (mg/dl)	2,8 ± 2,2	3,2 ± 2,4	-	n.s.
Troponin T (ng/ml)	2,0 ± 1,4	2,2 ± 1,9	-	
24 Stunden nach Zelltherapie				
Zahl der weißen Blutzellen (/nl)	8,5 ± 2,1	9,8 ± 1,9	-	0,02
C-reaktives Protein (mg/dl)	2,6 ± 2,3	3,1 ± 1,9	-	n.s.
Troponin T (ng/ml)	1,3 ± 1,0	1,5 ± 1,2	-	n.s.

CPR = Kardio-pulmonare Resuscitation

*ohne CPR-Patienten

Tabelle 2: Quantitative globale und regionale LV Funktion

BDP (n = 23)	Basislinie	Nachfolge	p-Wert
Ausstoß-Fraktion (%)	49 ± 10	58 ± 10	0,004
End-diastolisches Volumen (ml)	107 ± 25	108 ± 33	n.s.
End-systolisches Volumen (ml)	53 ± 14	45 ± 18	0,035
Regionale Wandbewegung (SD/Chord)			
Infarkt	- 1,5 ± 0,3	- 0,7 ± 0,6	< 0,001
Infarktmitte	- 1,6 ± 0,4	- 0,8 ± 0,7	< 0,001
Infarktgrenze	- 1,5 ± 0,2	- 0,5 ± 0,6	< 0,001

BMP (n = 23)	Basislinie	Nachfolge	p-Wert
Ausstoß-Fraktion (%)	49 ± 10	59 ± 9	0,003
End-diastolisches Volumen (ml)	114 ± 29	101 ± 33	n.s.
End-systolisches Volumen (ml)	57 ± 21	43 ± 21	0,003
Regionale Wandbewegung (SD/Chord)			
Infarkt	- 1,5 ± 0,3	- 0,5 ± 0,6	< 0,001
Infarktmitte	- 1,7 ± 0,4	- 0,7 ± 0,6	< 0,001
Infarktgrenze	- 1,4 ± 0,2	- 0,4 ± 0,7	< 0,001
Kontrolle (n = 15)	Basislinie	Nachfolge	p-Wert
Ausstoß-Fraktion (%)	50,3 ± 9,3	52,6 ± 9,4	0,379
End-diastolisches Volumen (ml)	101,3 ± 22,6	120,0 ± 47,0	0,108
End-systolisches Volumen (ml)	50,9 ± 16,7	57,6 ± 30,6	0,363
Regionale Wandbewegung (SD/Chord)	n.d.	n.d.	-

Tabelle 3: Ausgangslinien Parameter zwischen Patienten, die Zellen mit einer hohen migratorischen Kapazität erhielten verglichen mit denjenigen, die Vorläuferzellen mit geringer migratorischer Kapazität erhielten

Basislinie	hohe migratorische Kapazität n = 16	geringe migratorische Kapazität n = 15	p-Wert
Alter (Jahre)	48 ± 11	50 ± 9	n.s.
Geschlecht (männl./weibl.)	15 / 1	13 / 2	n.s.
Zahl Risikofaktoren (%)	2,7 ± 0,9	2,6 ± 0,9	n.s.
Infarktgebiet (ant./inf.; %)	75 / 25	60 / 40	n.s.
Ausstoß-Fraktion (%)	48 ± 8	49 ± 12	n.s.
End-diastolisches Volumen (ml)	104 ± 22	118 ± 25	n.s.
End-systolisches Volumen (ml)	53 ± 15	59 ± 20	n.s.
Regionale Wandbewegung (SD/Chord)			n.s.
Infarkt	- 1,5 ± 0,2	- 1,5 ± 0,3	n.s.
Infarktmitte	- 1,7 ± 0,3	- 1,6 ± 0,3	n.s.
Infarktgrenze	- 1,4 ± 0,2	- 1,5 ± 0,3	n.s.
Trennwand Bewe-	7,0 ± 2,4	6,7 ± 3,0	n.s.

gungswert			
Spät-	39 ± 44	35 ± 22	n.s.
Verstärkungsvolumen			
(ml)			

Tabelle 4A: Multivariate Analyse der unabhängigen Vorhersage-Faktoren der Infarktgrößen-Verringerung

	Δ Spät-Verstärkungsvolumen r	p-Wert
Geschlecht	- 0,094	n.s.
Alter	- 0,099	n.s.
Zeit zur Revaskularisierung	0,329	n.s.
Basislinien Ausstoßfraktion	0,784	0,016
Basislinien Spät-	0,184	n.s.
Verstärkungsvolumen		
Hohe / geringe Migration	- 0,883	0,007

Tabelle 4B: Multivariate Analyse der unabhängigen Vorhersage-Faktoren der regionalen Verbesserung der LV-Funktion

	Δ Trennwand-Bewegungswert r	p-Wert
Geschlecht	0,076	n.s.
Alter	0,6	0,035
Zeit zur Revaskularisierung	0,165	n.s.
Basislinien Ausstoßfraktion	0,403	n.s.
Basislinien Trennwand- Bewegungswert	- 0,735	0,008
Hohe / geringe Migration	- 0,619	0,021

Tabelle 5: Basislinien-Charakteristika der Studienpopulation

	Patienten ICMP n = 18	mit Gesunde kontrolle n = 8	Kon- trolle	p-Wert
Alter (Jahre)	$59,4 \pm 13,4$	54 ± 13		< 0,001
Geschlecht männlich (%)	88,9	87,5		0,65
Hochdruck (%)	57	0		< 0,001
Hyperlipidämie (%)	70	25		< 0,001
Diabetes (%)	17	0		< 0,001
Raucher (%)	82,4	37,5		< 0,001
Familienhistorie	52,9	25,0		< 0,001

auf KHE (%)			
KHE (1/2/3 Ge-fäßerkrankung %)	17,6 / 52,9 / 29,4	n.a.	
Historie von 100 KHE (%)		n.a.	
Infarktbereich (anterior / inferior) (%)	65 / 35	n.a.	
Ausstoßfraktion (visuell geschätzt)	37,8 ± 11,1	62,6 ± 3,1	< 0,001
Medikation nach Entlassung			
Aspirin (%)	100	0	
Clopidogel (%)	100	0	
ACE-Inhibitor (%)	100	0	
Betablocker (%)	100	0	
Statin (%)	100	0	
C-reaktives Protein (mg/dl)	3,0 ± 2,5	2,9 ± 1,7	0,51
Zahl der weißen Blutzellen ($\times 10^3/\text{nl}$)	7,9 ± 3,7	6,8 ± 2,9	0,85

Tabelle 6: Univariate lineare Regressionsanalyse des Zusammenhangs zwischen klinischen Charakteristika sowie den Messungen in vitro und der Neovaskularisierungs-Kapazität von BMP in einem Mausmodell von hinterer-Lappen Ischämie

	Patienten und gesunde Kontrollen		Nur Patienten	
	r	p-Wert	r	p-Wert
Alter	- 0,38	0,064	0,260	0,33
Geschlecht	0,032	0,87	- 0,165	0,49
Hochdruck	- 0,646	0,001	- 0,204	0,43
Hyperlipidämie	- 0,598	0,002	0,114	0,68
Familienhistorie auf KHE	- 0,403	0,019	0,134	0,61
Diabetes	- 0,641	0,001	- 0,088	0,74
Zahl der Risikofaktoren	- 0,540	0,006	0,174	0,52
NYHA Klassifizierung	- 0,630	0,001	- 0,116	0,66
Ausstoßfraktion (%)	0,720	0,001	0,315	0,273
Basale Migration	0,380	0,061	0,456	0,05
SDF-1 induzierte Migration	0,781	<0,001	0,634	0,004
VEGF induzierte	0,352	0,078	0,374	0,13

Migration			
Koloniebildende	0,740	<0,001	0,074
Kapazität			0,785

Patentansprüche

1. *In vitro* Verfahren zur Analyse einer Probe aus einem Säugetier in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
 - a) Isolieren von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker, und
 - b) Überprüfung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests.
2. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend den Vergleich des aus der untersuchten Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zu untersuchende Probe aus dem Menschen stammt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Knochenmark, peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei dem peripheren Blut ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin oder EDTA, zugesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die zu untersuchende Probe mittels Punktion aus dem Knochenmark entnommen wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Isolierung unter Verwendung von Dichte-Gradienten-Zentrifugation und/oder immunologischer Methoden erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Isolierung unter Verwendung von FACS erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der zellspezifische Oberflächenmarker für BMP ausgewählt ist aus CD34, CD45 und/oder CD133, und für BDP ausgewählt ist aus VEGFR2, CD105, vWF und/oder CD31.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Migrationstest in einer Boyden-Kammer durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Migrationstest unter der Verwendung von SDF-1 oder VEGF durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder andere Ursachen einer Herzschwäche.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Verfahren unmittelbar vor einer Zellinfusion in den Säuger durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die untersuchten isolierten BMP und/oder BDP für den Säuger autolog und/oder heterolog sind.
15. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen.
16. Verwendung des Kits nach Anspruch 15 zur Diagnose und/oder der Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen, zur Überwachung von deren Therapie und/oder zur Stratifizierung für eine geplante Zelltherapie mit Stamm- und Progenitorzellen zur Steigerung der Perfusion von ischämischen Gewebe bzw. zur Regeneration von Gewebeverlust bei z. B. Herzinsuffizienz.
17. *In vitro* Verfahren zur Isolierung von spezifischen Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteten zirkulierender Vorläuferzellen (BDP), umfassend:

- a) Entnehmen einer Probe aus einem Säugetier-Spender,
- b) Isolieren von (BMP) und/oder (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker aus der so erhaltenen Probe, und
- c) Überprüfung der kardivaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests.

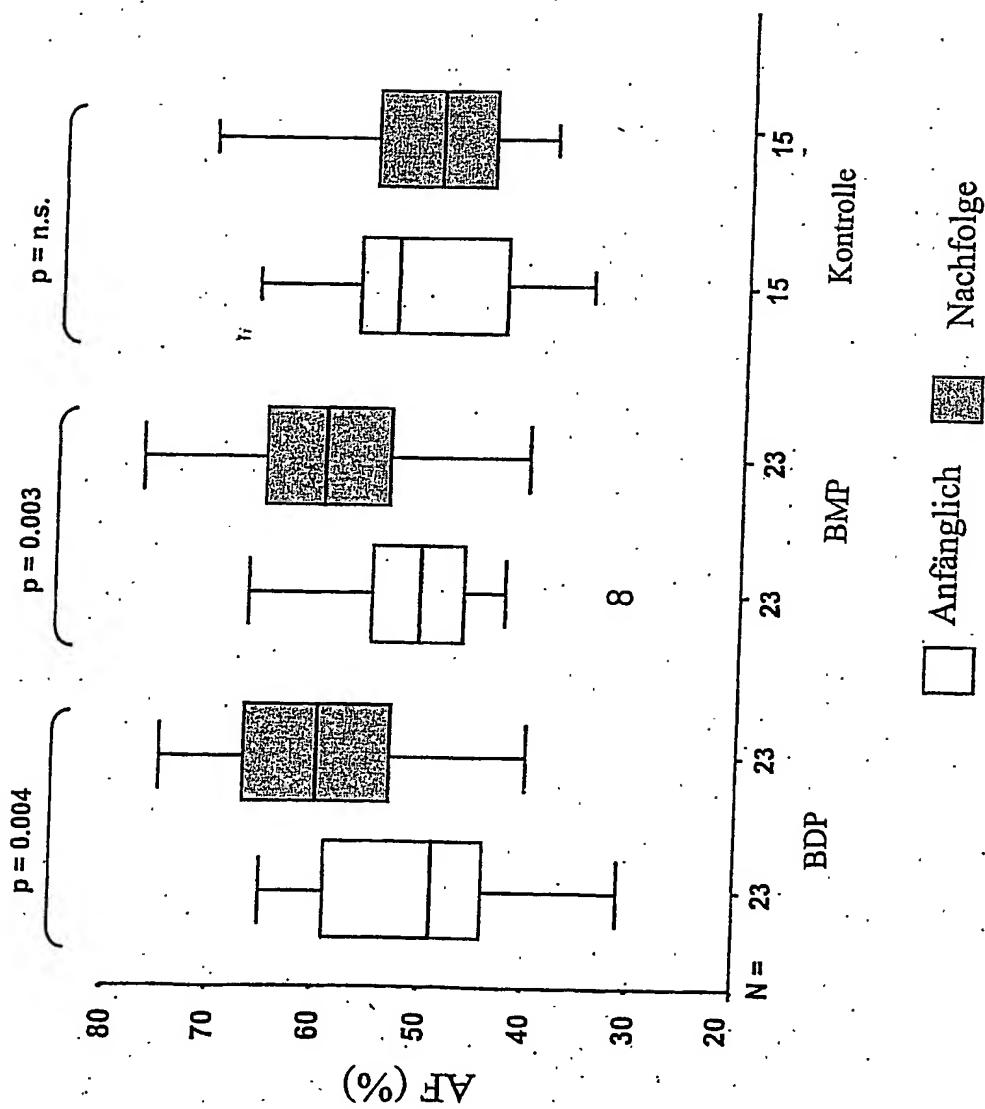
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die zu untersuchende Probe aus dem Menschen stammt.
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Knochenmark, peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die zu untersuchende Probe mittels Punktion aus dem Knochenmark entnommen wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die Isolierung unter Verwendung von Dichte-Gradienten-Zentrifugation und/oder immunologischer Methoden erfolgt.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die Isolierung unter Verwendung von FACS erfolgt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei der zellspezifische Oberflächenmarker für BMP ausgewählt ist aus CD34, CD45 und/oder CD133, und für BDP ausgewählt ist aus VEGFR2, CD105, vWF und/oder CD31.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 23, wobei der Migrationstest in einer Boyden-Kammer durchgeführt wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 24, wobei der Migrationstest unter der Verwendung von SDF-1 für BMP und VEGF für BDP durchgeführt wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 25, wobei die isolierten BMP und/oder BDP weiter genetisch modifiziert werden, um die Funktion der Zellen zu verbessern.

27. Spezifische Knochenmarks-Vorläuferzelle (BMP) oder Blut-abgeleitete zirkulierende Vorläuferzelle (BDP), hergestellt nach einem der Ansprüche 17 bis 26.
28. Spezifische Knochenmarks-Vorläuferzelle (BMP) oder Blut-abgeleitete zirkulierende Vorläuferzelle (BDP) nach Anspruch 27, wobei die isolierte BMP und/oder isolierte BDP für den Säuger autolog und/oder heterolog ist.
29. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26 und weiterhin Formulieren der pharmazeutischen Zusammensetzung durch Mischen mit herkömmlichen pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Formulierung weiterhin ein Mischen mit Statinen, insbesondere Atorvastatin, und/oder VEGF umfaßt.
31. Pharmazeutischen Zusammensetzung, hergestellt nach Anspruch 29 oder 30.
32. Verwendung einer spezifischen BMP und/oder BDP nach Anspruch 27 oder 28 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 31 zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP); dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder andere Ursachen einer Herzschwäche, wie Herzinsuffizienz.
33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die Behandlung die Zellinfusion in den Säuger umfaßt.
34. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die Behandlung weiterhin die Verabreichung von Statinen, insbesondere Atorvastatin, VEGF, und/oder Erythropoetin umfaßt.

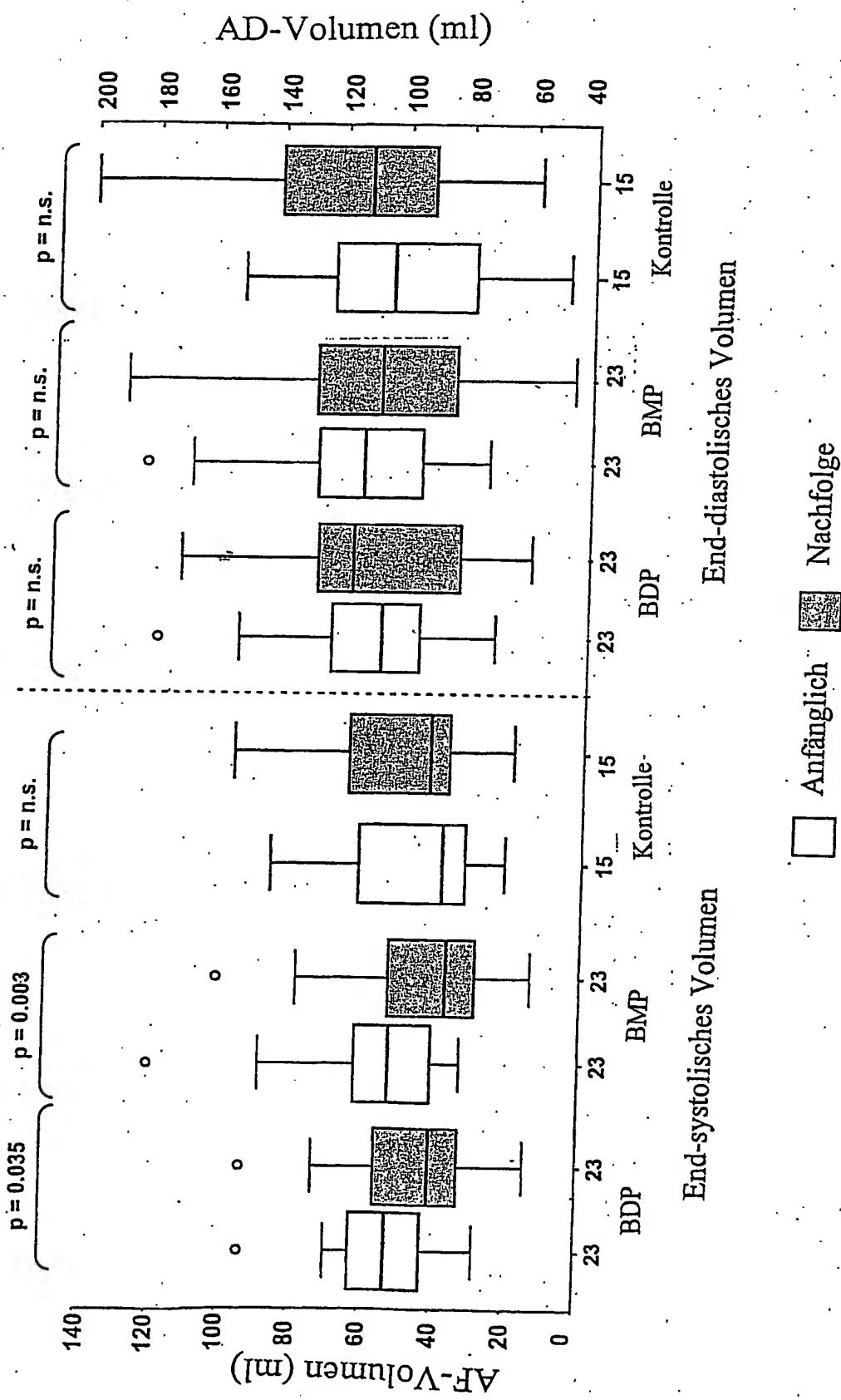
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein *in vitro* Verfahren zur Analyse einer Probe aus einem Säugetier in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt: a) Isolieren von Knochenmarks-Vorläuferzellen (BMP) und/oder Blut-abgeleiteter zirkulierender Vorläuferzellen (BDP) mittels zellspezifischer Oberflächenmarker, und b) Überprüfung der kardiovaskulären Funktionalität der isolierten BMP und/oder BDP mittels eines geeigneten Migrationstests. Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Kit im Rahmen der Diagnose und/oder der Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen, zur Überwachung von deren Therapie und/oder zur Stratifizierung für eine geplante Zelltherapie mit Stamm- und Progenitorzellen zur Steigerung der Perfusion von ischämischen Gewebe bzw. zur Regeneration von Gewebeverlust (z. B. Herzinsuffizienz) abgewendet werden. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung dann ein *in vitro* Verfahren zur Isolierung von spezifischen Knochenmarks-Vorläuferzellen mittels eines geeigneten Migrationstests. Diese BMP und/oder BDP können erfindungsgemäß zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus stabiler koronarer Herzerkrankung, akutem Koronarsyndrom, akutem Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Kardiomyopathie (ICMP), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder anderer Ursachen einer Herzschwäche verwendet werden.

Figur 1A: Quantitative L-Angiographie – globale Ausstoßfraktion



Figur 1B: Quantitative LV-Angiographie – Volumina



Korrelation zwischen Basislinien-Ausstoßfraktion und funktioneller Verbesserung

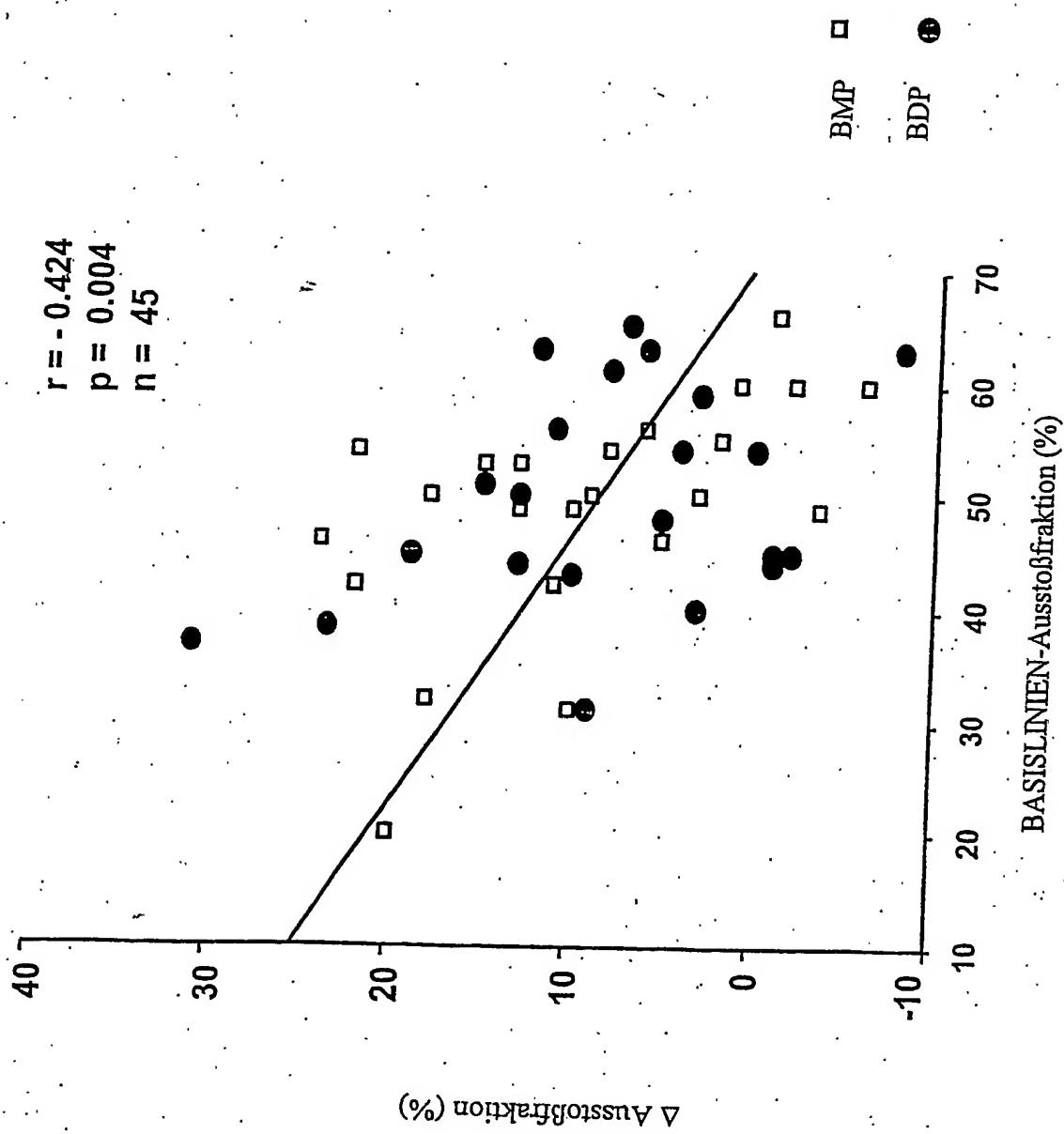
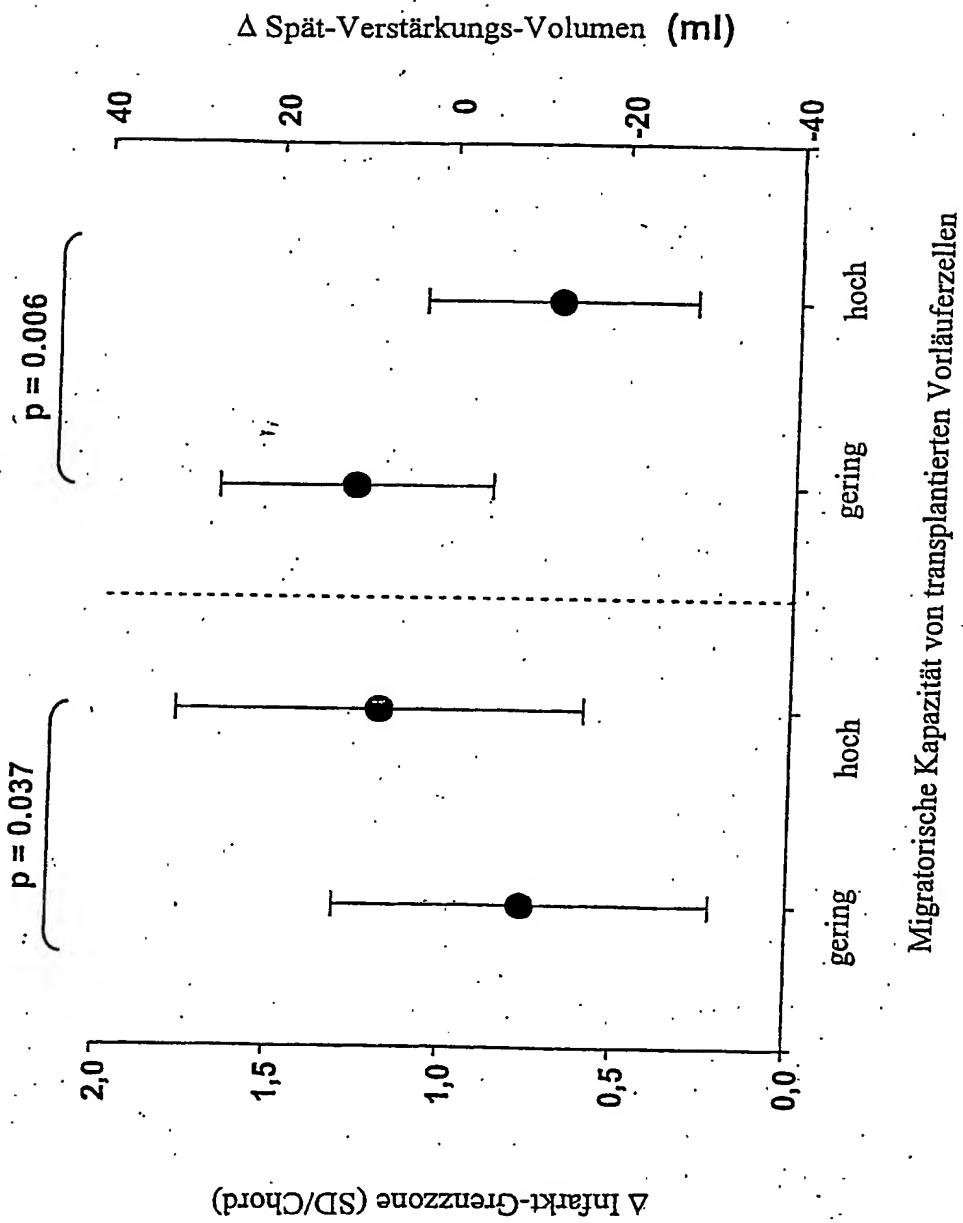
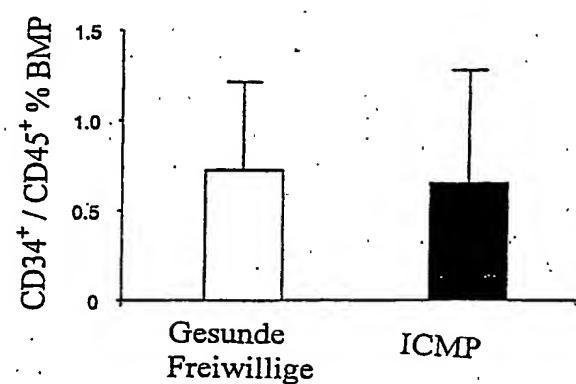
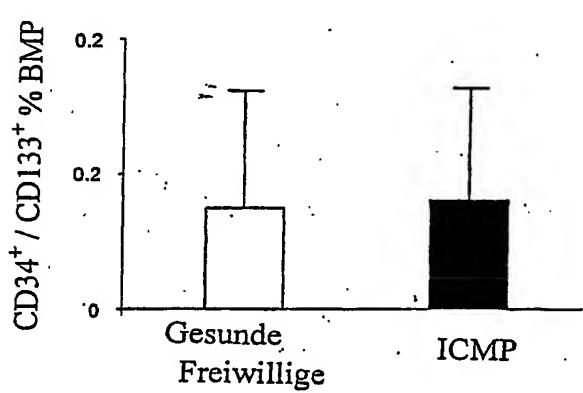
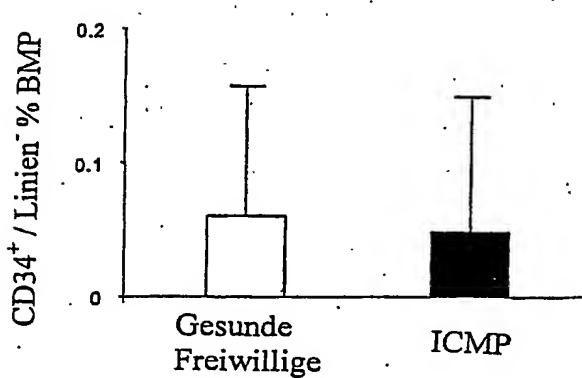


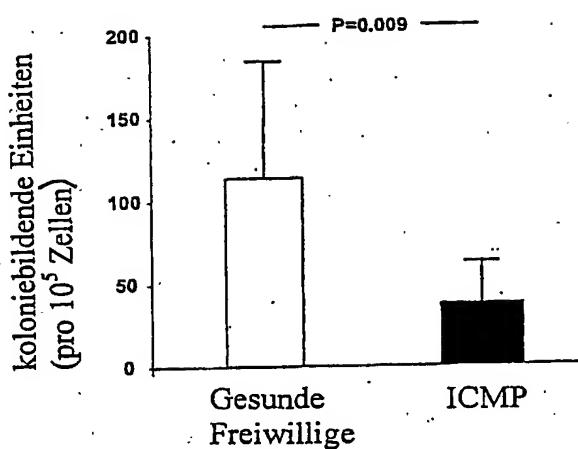
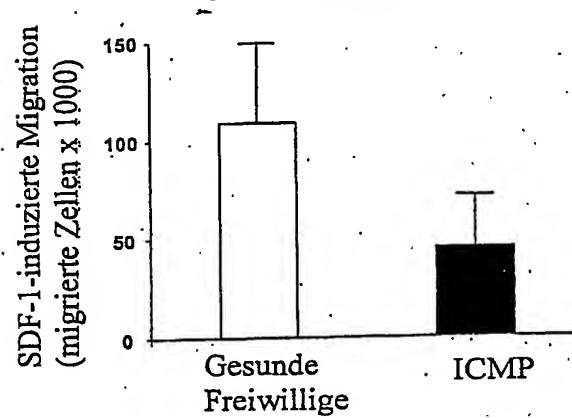
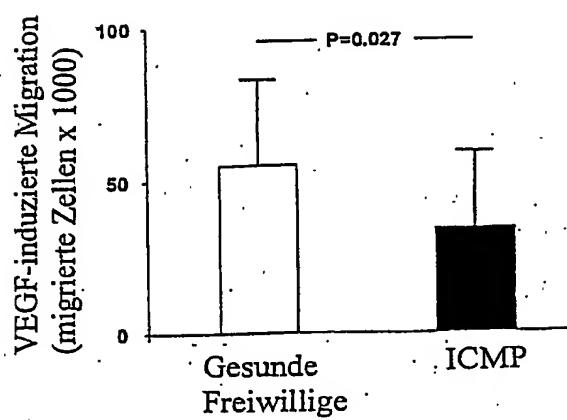
Figure 3: Migratorische Kapazität und Veränderungen in der regionalen Wandbewegung und Infarktgröße



Figur 4

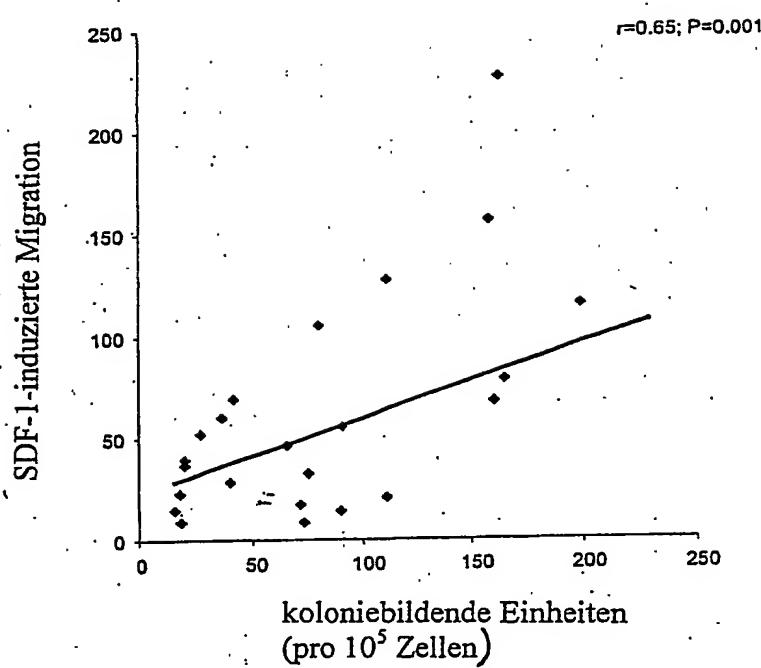
a**b****c**

Figur 5

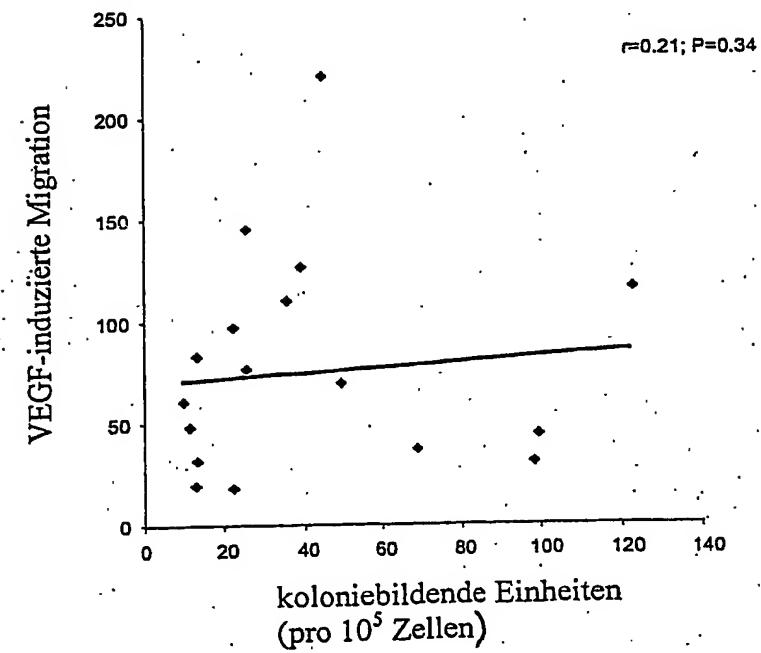
a*b**c*

Figur 5

d



e



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.